

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) **Patentschrift**  
(10) **DE 195 46 542 C 1**

(51) Int. Cl. 6:  
**C 12 N 5/00**  
C 12 M 3/00

- (21) Aktenzeichen: 195 46 542.3-41
- (22) Anmelddetag: 13. 12. 95
- (23) Offenlegungstag: —
- (25) Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 7. 5. 97

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(73) Patentinhaber:  
Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, DE

(74) Vertreter:  
Kühn, H., Pat.-Ass., 63450 Hanau

(72) Erfinder:  
Nagels, Hans-Otto, Dr., 37120 Bovenden, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
JP 05-0 30 972 A  
JP 20-36 190 A

(54) Verfahren zur Kultivierung adhärenter Zellen, dafür geeigneter Träger und den Träger enthaltendes Zellkultivierungsgefäß

(57) Um ausgehend von bekannten Verfahren zur Kultivierung adhärenter Zellen auf einem flächenhaft ausgebildeten, innerhalb einer Zellkulturmutter angeordneten Träger, an dem entlang ein flüssiges Versorgungsmedium bewegt wird, ein Zellkulturverfahren anzugeben, mit dem hohe Zeldichten erreichbar sind, wird erfindungsgemäß vorgeschlagen, daß ein die Form eines Bandes aufweisender, zu einer Spirale aufgewickelter Träger aus einer Membran oder einem Gewebe eingesetzt wird, daß die Zellkulturmutter mit Versorgungsmedium derart aufgefüllt wird, daß der Träger vom Versorgungsmedium vollständig bedeckt ist und daß die Spirale um ihre zentrale Achse rotiert wird. Weiterhin wird ein für die Durchführung des Verfahrens geeigneter Träger und ein Zellkultivierungsgefäß zur Aufnahme des flächenhaft ausgebildeten Trägers angegeben, wobei der Träger der retrokompatibel in bezug auf vorhandene Kulturgefäße ist und der aus einem flexiblen, die Form eines Bandes aufweisenden, als Membran oder Gewebe ausgebildeten Material besteht, spiralförmig aufgewickelt, und an einem Halteelement aus einem formstabilen Material befestigt ist und daß er ein poröses Netzwerk enthält.

**DE 195 46 542 C 1**

DE 195 46 542 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung adhärenter Zellen auf einem flächenhaft ausgebildeten, innerhalb einer Zellkulturkammer angeordneten Träger, an dem entlang ein flüssiges Versorgungsmedium bewegt wird. Weiterhin betrifft die Erfindung einen geeigneten, flächenhaft ausgebildeten Träger sowie ein Zellkultivierungsgefäß zur Durchführung des Verfahrens, mit einer Zellkulturkammer, in der ein derartiger Träger angeordnet ist.

Ein Zellkultivierungsverfahren, ein Träger und ein Zellkultivierungsgefäß gemäß der eingangs genannten Gattung sind aus der US-PS 4,317,886 bekannt. Darin wird ein besonders gestaltetes rollerflaschenähnliches Kulturgefäß beschrieben, das aus einem zylinderförmigen Außengehäuse besteht, innerhalb von dem mehrere Rohre koaxial zueinander angeordnet sind, wobei zwischen den Rohren ein definierter Ringspalt für die Zellkultur verbleibt. Die Rohre weisen in etwa die gleiche Länge auf wie das Außengehäuse und werden mittels zweier an den Stirnseiten des Außengehäuses angeordneter Abstandshalter fixiert. Bei der Zellkultivierung dienen die Rohr-Oberflächen adhärenten Zellen als Träger.

Beide Stirnseiten des rohrförmigen Außengehäusen sind mittels abnehmbarer Endkappen flüssigkeitsdicht verschlossen. In einer der Endkappen ist ein verschließbarer Ausgießer vorgesehen.

Zur Durchführung des Kultivierungsverfahrens wird in das rollflaschenähnliche Kulturgefäß die zu kultivierende Zellkultur gegeben und das Gefäß teilweise mit einer geeigneten Nährmittellösung aufgefüllt. Die Füllhöhe ist dabei so gewählt, daß bei waagerechter Orientierung des Kulturgefäßes das innerste Rohr von der Nährmittellösung umspült wird. Während der Zellkultivierung wird das rollflaschenähnliche Gefäß um seine Längsachse rotiert. Dabei werden die Rohr-Oberflächen und die darauf wachsenden Zellen von der Nährmittellösung umspült.

Während des Kultivierungsverfahrens wird die Nährmittellösung von den Zellen verbraucht und gleichzeitig mit Stoffwechselprodukten angereichert.

Die Nährmittellösung kann während einer Umdrehung des Kulturgefäßes um seine Längsachse die engen Ringspalte nicht vollständig verlassen und bleibt teilweise an den Rohr-Oberflächen haften. Bei dem bekannten Verfahren findet daher kein ausreichender Austausch des Nährmediums zwischen den einzelnen Ringspalten statt, so daß hohe Zeldichten nicht erreicht werden.

Das bekannte Kulturgefäß besteht aus vielen Einzelteilen, wie dem Außengehäuse, den darin angeordneten Rohren, Abstandshaltern, Endkappen und Dichtmitteln. Es ist daher relativ aufwendig zu montieren.

Die im bekannten Kulturgefäß als Träger verwendeten Rohre und die Abstandshalter sind in üblichen Rollerflaschen, die stirnseitig nicht geöffnet werden können, nicht verwendbar.

Aus JP 05-030972-A ist eine Vorrichtung zur Reinigung von Abwasser mit Hilfe von Mikroben bekannt. Der dabei verwendete Träger hat die Form eines Schlauches, der in Form einer Sprungfeder (das heißt schraubenförmig gewunden) ausgebildet ist. Die Mikroben befinden sich in einer Flüssigkeit innerhalb des Schlauches und wirken dort auf das Abwasser ein.

Ein ähnlicher Träger ist in JP 62036-109-A offenbart. Derartige Träger sind nicht zur Kultivierung von Zellkulturen adhärenter Zellen geeignet.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Zellkulturverfahren anzugeben, mit dem hohe Zeldichten erreichbar sind und einen Träger hierfür, der retrokompatibel in bezug auf vorhandene Kulturgefäße ist, sowie ein Zellkultivierungsgefäß bereitzustellen, das einfach handhabbar und preisgünstig herstellbar ist.

Hinsichtlich des Verfahrens wird diese Aufgabe ausgehend von dem eingangs beschriebenen Verfahren erfundungsgemäß dadurch gelöst, daß ein die Form eines Bandes aufweisender, zu einer Spirale aufgewickelter Träger aus einer Membran oder einem Gewebe eingesetzt wird, daß die Zellkulturkammer mit Versorgungsmedium derart aufgefüllt wird, daß der Träger vom Versorgungsmedium vollständig bedeckt ist und daß die Spirale um ihre zentrale Achse rotiert wird.

Die Bewegung des Versorgungsmediums entlang des in Form einer Spirale geformten Trägers kann durch Rotation der Spirale oder durch Rotation der gesamten Zellkulturkammer, wie es bei dem Verfahren gemäß dem Stand der Technik beschrieben ist, erreicht werden. Die spirale Form des Trägers bewirkt, daß das am einen Ende der Spirale eintretende Versorgungsmedium im wesentlichen die gesamte Spirale durchläuft und am anderen Ende der Spirale wieder austritt. Die Spirale wirkt daher ähnlich wie eine Schaufelpumpe, wobei die treibende Kraft für den Durchtritt des Versorgungsmediums auf der Schwerkraft und auf der die Rotation bewirkenden Kraft beruht.

Es ist nicht erforderlich, daß die Stirnseiten der Spirale geschlossen sind. Dadurch, daß der Träger vom Versorgungsmedium vollständig bedeckt ist, wird der Austritt vom Versorgungsmedium gegebenenfalls auch aus offenen Stirnseiten der Spirale verlangsamt und damit vernachlässigbar.

Wesentlich ist, daß der Träger vom Versorgungsmedium vollständig bedeckt ist. Das bedeutet, daß beispielsweise bei einer waagerechten Orientierung der Mittelachse der Spirale innerhalb der Zellkulturkammer, die Füllhöhe des Versorgungsmediums so hoch sein muß, daß auch die äußerste Windung der Spirale stets von Versorgungsmedium umgeben ist. Unter dem Ausdruck "Versorgungsmedium" wird dabei dasjenige flüssige Medium innerhalb der Zellkulturkammer verstanden, das die Zellkultur umgibt. Da die Zellkultur ständig von Versorgungsmedium umgeben ist, und dieses wiederum aufgrund der sich relativ zum Versorgungsmedium bewegenden Spirale kontinuierlich und zwangsläufig "umgepumpt" und so unmittelbar an der Oberfläche der Spiral-Windungen laufend ausgetauscht wird, werden sehr hohe Zeldichten in der Zellkultur erreicht.

Die Spirale wird um ihre zentrale Achse rotiert. Durch die Rotation der Spirale innerhalb der Zellkulturkammer wird der Durchgang des Versorgungsmediums durch die Windungen der Spirale noch gefördert. Bei dieser Verfahrensweise ist es nicht erforderlich, die Zellkulturkammer zu bewegen. Durch die Rotation der Spirale wird ein besonders intensiver Austausch von Versorgungsmedium erreicht.

Dabei hat es sich besonders bewährt, von außerhalb der Zellkulturkammer im Bereich der Spirale ein Drehfeld zu erzeugen, mittels dem die Spirale rotiert wird. Hierdurch wird die Rotation der Spirale erreicht, ohne daß von außerhalb der Zellkulturkammer irgendwelche Hilfsmittel in diese hineinragen und ohne daß Drehdurchführungen erforderlich sind, die regelmäßig Probleme hinsichtlich der Dichtigkeit bereiten. Das von au-

Berhalb der Zellkulturmutter erzeugte Drehfeld ver-einfacht somit das Verfahren und bereitet keine Probleme hinsichtlich möglicher Kontaminationen der Zellkul-tur.

Das Drehfeld kann gemäß der Erfindung beispiels-weise durch rotierende Magnete erzeugt werden. Das Drehfeld kann beispielsweise an der Zylindermantelflä-che der Spirale oder an einer Stirnseite der Spirale ange-griffen.

Besonders bewährt hat sich ein Verfahren, bei dem die Spirale mit einem magnetischen Läuferelement fest verbunden ist, das mittels eines außerhalb der Zellkul-turmutter angeordneten Magnetmotors bewegt wird. Derartige Magnetmotoren sind handelsüblich, einfach re-gelbar und auf die für die Erzielung hoher Zelldichten geeignete Drehzahl leicht einstellbar.

Hinsichtlich des Trägers wird die oben angegebene Aufgabe erfundengemäß dadurch gelöst, daß er aus einem flexiblen, die Form eines Bandes aufweisenden, als Membran oder Gewebe ausgebildeten Material be-steht, spiraling aufgewickelt, und an einem Haltelement aus einem formstabilen Material befestigt ist und daß er ein poröses Netzwerk enthält.

Dadurch, daß der Träger in Form einer Spirale aufge-wickelt ist, stellt er eine große Oberfläche für die Zell-kultur zur Verfügung. Dabei ist zu gewährleisten, daß zwischen benachbarten Windungen der Spirale ein Ab-stand bleibt. Üblicherweise ist der Träger aus einem Stück gefertigt und daher besonders einfach handhab-bar.

Der erfundengemäße Träger ist in vorhandene Kul-turgefäße, wie beispielsweise übliche Rollerflaschen, einfach einsetzbar. Dies wird dadurch erreicht, daß er aus einem flexiblen Material besteht. Das flexible Mate-rial erlaubt es, die Spirale unter Verkleinerung ihres Außendurchmessers eng zu rollen. Danach kann sie durch die Ein- oder Ausfüllöffnung jeder gebräuchli-chen Rollerflasche eingeführt werden, wonach sie sich innerhalb der Rollerflasche, beispielsweise aufgrund ih-rer Elastizität, wieder entfalten kann und dabei wieder einen größeren Außendurchmesser einnimmt. Der erfundengemäße Träger ist daher als "Aufrüstset" für handelsübliche Rollerflaschen verwendbar.

Das Haltelement dient zur Fixierung der Spirale in-nerhalb der Zellkulturmutter des Kulturgefäßes und kann gleichzeitig den erforderlichen Abstand zwischen den Windungen der Spirale gewährleisten. Das Halte-element kann beispielsweise in Form eines einfachen Stäbchens oder einer Spule ausgebildet sein, wobei der Träger an der Stab- bzw. Spulenachse angreift, die gleichzeitig der Mittellachse der Spirale entspricht. Üblicherweise entspricht die Länge eines solchen länglichen Haltelementes etwa der Länge der entsprechenden Abmessung der Zellkulturmutter. Falls erforderlich, kann die Spirale mittels des Haltelementes in der Zell-kulturmutter fixiert sein. Mittels des Haltelements kann außerdem die Einhaltung eines vorgegebenen Ab-standes zwischen benachbarten Windungen der Spirale gewährleistet werden.

Zur Halterung der Spirale innerhalb der Zellkulturmutter ist es erforderlich, daß das Haltelement selbst aus einem formstabilen Material besteht.

Ein "flexibler" Träger im Sinne der Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß er ohne größeren Kraftaufwand zu einer Spirale aufgerollt werden kann. Elastische Ei-genschaften des Trägers sind nicht unbedingt erforderlich.

Der Träger ist aus einem porösen Material. Hier-

durch werden besonders große Oberflächen für die zu kultivierenden Zellen bereitgestellt, so daß hohe Zell-dichten erreichbar sind. Poröse Materialien im Sinne der Erfindung sind beispielsweise die für die Herstellung semipermeabler Membranen verwendeten Materialien. Es hat sich aber auch ein Träger aus textilem Gewebe als geeignet erwiesen. Textiles Gewebe im Sinne der Erfindung sind auch solche Textilien, die nicht gewebt, sondern beispielsweise gestrickt oder gewirkt sind.

Hinsichtlich des Zellkultivierungsgefäßes wird die oben angegebene Aufgabe erfundengemäß dadurch gelöst, daß der Träger aus einem flexiblen, als Band aus einer Membran oder einem Gewebe ausgebildeten Ma-terial besteht, zu einer Spirale aufgewickelt und an ei-nem Haltelement aus einem formstabilen Material be-festigt ist und daß die Zellkulturmutter einerseits von einer für die Aufnahme des Versorgungsmediums vor-gesehenen Versorgungskammer durch eine semiperme-able Membran und andererseits von der Umgebungsat-mosphäre durch eine für Flüssigkeiten undurchlässige, für Gase jedoch durchlässige Gasaustauschmembran getrennt ist.

Dadurch, daß der Träger aus einem flexiblen Material besteht und spiraling aufgewickelt ist, ist er besonders einfach handhabbar. Er kann beispielsweise als Aus-tauschteil für das Zellkultivierungsgefäß ausgebildet sein.

Das Versorgungsmedium ist entlang der Spirale durch Rotation der Zellkulturmutter und/oder des Trägers selbst bewegbar. Übliche Rollerflaschen kön-nen mittels des erfundengemäßen Trägers aufgerüstet werden. Hierzu wird der flexible Träger zu einer Spirale mit kleinem Außendurchmesser aufgerollt, in die Ein-füllöffnung einer üblichen Rollerflasche eingeführt und innerhalb der Rollerflasche wieder zu einer Spirale mit größerem Außendurchmesser entspannt. Dichtigkeits-probleme treten bei derartigen Zellkultivierungsgefäß-en nicht auf.

Ein Zellkultivierungsgefäß ist beispielsweise in der DE-A1 42 29 325 beschrieben. Wird ein erfundengemäßer Träger, der besonders große Oberflächen in ei-nem kleinen Volumen bereitstellt, in eine derartige Zellkulturmutter eingesetzt, werden besonders hohe Zell-dichten pro Volumeneinheit erreicht. Auch hier kann der Träger wiederum als steriles Austauschteil ausgebil-det sein. Probleme hinsichtlich der Dichtigkeit oder der Kontamination der Zellkultur innerhalb der Zellkulturmutter entstehen dadurch nicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Zellkulti-vierungsgefäßes ist das Haltelement mit einem magne-tischen, magnetisierbaren oder elektrisch leitenden Läu-ferelement fest verbunden, und außerhalb der Zellkul-turmutter ist ein Drehfeldgenerator vorgesehen, der mit dem Läuferelement unter Rotation des Halteele-mentes um die Längsachse der Spirale zusammenwirkt. Der spiralförmig aufgewickelte Träger wirkt bei der Rotation der Spirale nach Art einer Schaufelpumpe. Das heißt, daß an dem einen Ende der Spirale eintretende Versorgungsmedium durchläuft die gesamte Spirale und tritt erst am gegenüberliegenden Ende wieder aus. Die spiralförmige Anordnung der Membran hat über-dies den Vorteil, daß auf kleinstem Raum sehr große Oberflächen zur Verfügung gestellt werden können. Dadurch, daß das Drehfeld von außerhalb der Zellkul-turmutter erzeugt wird, werden Drehdurchführungen und die damit verbundene Kontaminationsgefahr ver-mieden.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der

Zeichnung dargestellt und werden nachfolgend näher erläutert. In der Zeichnung zeigen im einzelnen in schematischer Darstellung

Fig. 1 einen erfundungsgemäßen Trägers und einen Halter in perspektivischer Ansicht,

Fig. 2 eine Explosionszeichnung eines unter Verwendung eines erfundungsgemäßen Trägers hergestellten Produktionsmoduls bei einem bekannten Zellkultivierungsgefäß,

Fig. 3 eine unter Verwendung eines erfundungsgemäßen Trägers hergestellte Zellkulturmutterkammer mit Magnetmotor in perspektivischer Ansicht und

Fig. 4 einen unter Verwendung des erfundungsgemäßen Trägers hergestellten Perfusionsreaktor.

Bei der in Fig. 1 dargestellten Ausführungsform der Erfindung ist die Bezugsziffer 1 einer als Träger für die Zellkultur dienenden, spiralförmig aufgewickelten Membran zugeordnet. Die Membran 1 ist aus einem Stück gefertigt und weist, auseinandergerollt, die Form eines langgestreckten Bandes auf. Das eine Ende der Membran ist an einem Haltestab 2, der eine Länge von ca. 10 cm hat, befestigt. Der Deutlichkeit halber ist in der Fig. 1 nur etwa dreiviertel einer oberen Wicklung der Membran 1 dargestellt. Die einzelnen Wicklungen der Membran 1 halten voneinander einen Abstand von ca. 1 mm. Der Abstand wird dadurch gewährleistet, daß die bandförmige Membran 1 an ihren beiden Längsseiten mit einer ca. 1 mm breiten und ca. 1 mm hohen, flexiblen Auflage 3 versehen ist. Die Gesamtoberfläche der Membran 1 beträgt ca. 3.600 cm<sup>2</sup>. Dabei ist zu beachten, daß die Membran 1 beidseitig von Zellen bewachsen werden kann. Der in der Fig. 1 dargestellte Träger kann in jede handelsübliche Rollerflasche eingesetzt werden. Er ist als Nachrüst-Set hierfür geeignet. Hierzu wird die Membran 1 so eng wie möglich aufgewickelt. Die Auflage 3, die aus einem weichen elastischen Material besteht, wird dabei zusammengedrückt. Die so eng gewickelte Spirale 21 wird in die Einfüllöffnung der Rollerflasche eingeführt. In der Rollerflasche entspannt sich die Auflage 3 wieder und nimmt ihre vorgesehene Dicke an, so daß der Außen Durchmesser der Spirale 21 wieder größer wird und sich der gewünschte Abstand zwischen den einzelnen Windungen einstellt.

In einer alternativen Ausführungsform, die in den Figuren nicht dargestellt ist, ist anstelle der Membran ein Gewebe in Form einer Spirale 21. Das Gewebe ist aus Fäden mit Durchmessern zwischen 11 µm und 59 µm hergestellt. Anstelle der in Fig. 1 dargestellten Auflage kann zur Gewährleistung des Abstandes zwischen den einzelnen Windungen der Spirale, ein spulenförmiger Halter vorgesehen sein, der beidseitig mit gitterförmigen Seitenteilen versehen ist. An den Seitenteilen werden die Ränder des Gewebes gehalten und so der Abstand zwischen benachbarten Windungen der Spirale 22 gewährleistet.

In der Explosionszeichnung gemäß Fig. 2 ist ein Produktionsmodul eines Kultivierungsgefäßes dargestellt, wie es in der DE-A1 42 29 325 beschrieben ist. Bei diesem Produktionsmodul, dem insgesamt die Bezugsziffer 4 zugeordnet ist, handelt es sich um die Zellkulturmutterkammer bei einem Mehrkammer-Kultivierungsgefäß. Dabei ist das Produktionsmodul 4, in dem die Zellen kultiviert werden, durch eine Dialysemembran 8 von einem Versorgungsmodul (in der Fig. 2 nicht dargestellt) getrennt. Das Produktionsmodul 4 gemäß der in Fig. 2 dargestellten Ausführungsform besteht aus einem Haltering 5 aus einem stabilen Kunststoff, beispielsweise aus einem Polycarbonat, in das eine Silikonmembran

6 eingelegt ist, die den Gasaustausch bei der Zellkultivierung dient, einem spiralförmig aufgewickelten Einsatz 7 aus einem Membran-Material und aus der Dialysemembran 8. Die Dialysemembran 8 dient dem Austausch von Nährstoffen in das Produktionsmodul 4 und von Stoffwechselprodukten aus dem Produktionsmodul 4. Der Haltering 5 ist mit mehreren Einfüllstutzen 9 versehen, die mittels Kappen 10 verschließbar sind. Die flüssigkeitsdichte Befestigung des Produktionsmoduls 4 am Versorgungsmodul erfolgt mittels Schnapphaken 11.

Die Höhe des Halterings 5 beträgt im Ausführungsbeispiel ca. 1 cm, sein Innendurchmesser ca. 8 cm. Der spiralförmige Einsatz 7 stellt innerhalb des Produktionsmoduls eine Oberfläche von ca. 500 cm<sup>2</sup> zur Verfügung. Der spiralförmige Träger 7 kann bei dieser Ausführungsform aus einem steifen Material bestehen, so daß auf einer Haltevorrichtung zur Fixierung innerhalb des Produktionsmoduls 4 verzichtet werden kann.

Zur Vergrößerung der Gasaustauschfläche ist die Silikonmembran 6 mit hohlen Noppen 12 ausgebildet, die ins Innere des Produktionsmoduls 4 ragen und die nach außen hin offen sind.

Das Produktionsmodul 4 ist um seine Mittelachse, die mit der Bezugsziffer 38 gekennzeichnet ist, rotierbar. Die Rotationsachse 38 entspricht gleichzeitig der Mittelachse des spiralförmigen Einsatzes 7.

In einer alternativen, in den Figuren nicht dargestellten Ausführungsform wird die in Fig. 1 gezeigte, spiralförmig aufgewickelte Membran 1 mitsamt des Haltestabes 2 in das Versorgungsmodul eines Kultivierungsgefäßes eingebracht, wie es in der DE-A1 42 29 325 beschrieben ist. Dies wird dadurch erleichtert, daß bei diesem bekannten Kulturgefäß das Produktionsmodul, das mittels der Schnapphaken 11 an dem Versorgungsmodul angeklickt ist, einfach abgenommen werden kann. Durch die dabei freierwerdende relativ große Öffnung kann die Membran 1 sehr einfach in das Versorgungsmodul eingebracht werden. Bei dieser Ausführungsform ist zwischen dem Versorgungsmodul und dem Produktionsmodul keine semipermeable Dialysemembran vorgesehen.

Bei der in Fig. 3 dargestellten Ausführungsform der Erfindung ist eine wie anhand Fig. 1 näher beschriebene, spiralförmig aufgewickelte Membran 1, ein Haltestab 2 und eine Auflage 3 innerhalb eines Perfusionsreaktors, dem insgesamt die Bezugsziffer 13 zugeordnet ist, angeordnet. Der Perfusionsreaktor 13 weist im wesentlichen eine hohlzyindrische Form auf. Seine im übrigen geschlossenen Stirnseiten sind einerseits mit einem Einlaß 14 für frische Nährmittellösung und andererseits mit einem Auslaß 15 für verbrauchte Nährmittellösung versehen. An einem Ende des Haltestabes 2 ist ein Magnet 20 befestigt. Auf der entsprechenden Stirnseite 16 des Perfusionsreaktors 13 ist ein Magnetmotor 17 angeordnet, der mit dem Magneten 20 zusammenwirkt und dadurch den Haltestab 2 in Richtung des Pfeiles 18 rotiert. Die Rotationsachse 19 entspricht dabei gleichzeitig der Mittelachse der Spirale. Die sich im Inneren des Perfusionsreaktors 13 drehende Spirale 21 samt Haltestab 2 und Auflage 3 weist insgesamt eine Dichte von weniger als 1 g/cm<sup>3</sup> auf und schwimmt daher in der Nährmittellösung. Eine Befestigung der Spirale 21 innerhalb des Perfusionsreaktors 13 ist nicht erforderlich.

Der gezeigte Perfusionsreaktor 13 ist insbesondere für die Kultivierung solcher adhärenter Zellen geeignet, die die Zellprodukte in der Zelle selbst erhalten und nicht nach außen freisetzen. In der schematischen Darstellung gemäß Fig. 4 ist ein ähnlicher Perfusionsreak-

tor 13, wie er anhand Fig. 3 näher beschrieben ist, dargestellt. Der Perfusionsreaktor 13 weist einen Einlaß 14 für unverbrauchtes Versorgungsmedium 28 und einen Auslaß 15 für verbrauchtes Versorgungsmedium 28 auf. Innerhalb des Perfusionsreaktors 13 ist eine um ihre 5 Mittelachse rotierbare Spirale 21 angeordnet. Die Spirale 21 besteht aus einem spiraling aufgewickelten, flexiblen Gewebeband, das mit einem schmalen Ende an der Längsachse 23 einer Spule 22 befestigt ist. Die Spule 22 weist beiderseits der Längsachse 23 zwei Seitenteile 24 10 auf, zwischen denen die Spirale 21 verläuft. Die Seiten- teile 24 sind gitterartige ausgebildet und gewährleisten so den Abstand benachbarter Windungen der Spirale 21. An der Spule 22 ist stornseitig ein Magnetstäbchen 25 befestigt. Dem Magnetstäbchen 25 liegt außerhalb des 15 Perfusionsreaktors 13 ein Magnetmotor 26 gegenüber, der über eine Andockstelle 27 mit der entsprechenden Stirnseite 16 des Perfusionsreaktors 13 verbunden ist.

Nachfolgend wird das erfundungsgemäße Zellkultivierungsverfahren anhand eines Ausführungsbeispiels 20 und anhand Fig. 4 näher erläutert.

Der Perfusionsreaktor 13 wird mit einem geeigneten Versorgungsmedium 28 teilweise aufgefüllt. Der Füll- stand des Versorgungsmediums 28 ist dabei so gewählt, daß die Spirale 21 vollständig vom Versorgungsmedium 25 28 bedeckt ist. Das Versorgungsmedium wird dem Per- fusionsreaktor 13 aus einem Vorratsbehälter 29 kontinuierlich mittels einer Pumpe 31 zugeführt. Dabei durchläuft das Versorgungsmedium 28 einen Oxygenator 30, in dem es mit Sauerstoff angereichert wird. Der 30 Oxygenator 30 besteht im wesentlichen aus einem Behälter, mit Wandungen aus einer gasdurchlässigen Silikonfolie. Der Vorratsbehälter 29 hat beispielsweise ein Volumen von 20 l, der Perfusionsreaktor ein Volumen von ca. 500 ml.

In den Perfusionsreaktor 13 wird die zu kultivierende Zellkultur eingeimpft und, nachdem sich die Zellen auf der Oberfläche der Spirale 21 festgesetzt haben, das Versorgungsmedium 28 kontinuierlich durch Umpumpen aus dem Vorratsbehälter 29 in einen Abfallbehälter 40 32 ausgetauscht. Für den Druckausgleich ist ein Entlüf- tungsröhrchen 33 vorgesehen, das einerseits mit der Luftblase 34 innerhalb des Perfusionsreaktors 13 und andererseits mit der Umgebungsatmosphäre über einen Sterilfilter 35 verbunden ist.

Während der Zellkultivierung wird die Spule 22 mit- samt der darauf aufgewickelten Spirale 21 um ihre Längsachse 23 gedreht. Sie schwimmt dabei innerhalb des Versorgungsmediums 28 auf, da ihre Dichte insge- 50 samt kleiner als 1 g/cm<sup>3</sup> ist.

Durch die Rotation der Spirale 21 innerhalb des Ver- sorgungsmediums 28 wirkt diese wie eine Schaufelpum- pe, so daß das Versorgungsmedium 28 von einem Ende der Spirale 21 beginnend kontinuierlich über sämtliche Windungen bis zum gegenüberliegenden Ende geführt 55 wird und so ein stetiger Austausch von verbrauchtem Versorgungsmedium 28 gewährleistet ist. Tote Winkel, in denen kein Austausch stattfindet werden vermieden; aufgrund der Rotation der Spirale 21 ist der Austausch besonders intensiv. Dadurch werden besonders hohe 60 Zeldichten erreicht.

Nach Abschluß des Zellkultivierungsverfahrens wer- den dem Perfusionsreaktor 13 über einen Bruchkonek- tor 36 ca. 300 ml einer Trypsinlösung aus einem Trypsin- behälter 37 zugeführt. Das Trypsin bewirkt die Ablö- 65 sung der Zellen von den Oberflächen der Spirale 21 und ermöglicht deren Abernten.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung adhärenter Zellen auf einem flächenhaft ausgebildeten, innerhalb ei- ner Zellkulturkammer angeordneten Träger, an dem entlang ein flüssiges Versorgungsmedium be- weg- wird, dadurch gekennzeichnet, daß ein, die Form eines Bandes aufweisender, zu einer Spirale (7; 21) aufgewickelter Träger (1) aus einer Mem- bran oder einem Gewebe eingesetzt wird, daß die Zellkulturkammer (4; 13) mit Versorgungsmedium (28) derart aufgefüllt wird, daß der Träger (1) vom Versorgungsmedium (28) vollständig bedeckt ist und daß die Spirale (7; 21) um ihre zentrale Achse (23) rotiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn- zeichnet, daß von außerhalb der Zellkulturkammer (4; 13) im Bereich der Spirale (7; 21) ein Drehfeld erzeugt wird, mittels dem die Spirale (7; 21) rotiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekenn- zeichnet, daß die Spirale (7; 21) mit einem magne- tischen Läuferelement (25) fest verbunden ist, das mittels eines außerhalb der Zellkulturkammer (4; 13) angeordneten Magnetmotors (26) bewegt wird.

4. Flächenhaft ausgebildeter Träger zur Aufnahme der Zellkultur bei der Durchführung des Verfah- rens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einem flexi- blem, die Form eines Bandes aufweisenden, als Membran oder Gewebe ausgebildeten Material besteht, spiraling aufgewickelt, und an einem Halte- element (2; 22) aus einem formstabilen Material befestigt ist und daß er ein poröses Netzwerk ent- hält.

5. Träger (1; 21) nach Anspruch 4, dadurch gekenn- zeichnet, daß er aus einem textilen Gewebe be- steht.

6. Zellkultivierungsgefäß zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, mit einer Zellkulturkammer, in der ein flächenhaft aus- gebildeter Träger (1; 21) für die Zellkultur angeord- net ist, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger (1) aus einem flexiblen, als Band aus einer Membran oder einem Gewebe ausgebildeten Material be- steht, zu einer Spirale (7; 21) aufgewickelt, und an einem Halteelement (2; 22) aus einem formstabilen Material befestigt ist und daß die Zellkulturkam- mer (4) einerseits von einer für die Aufnahme des Versorgungsmediums (28) vorgesehenen Versor- gungskammer durch eine semipermeable Mem- bran (8), und andererseits von der Umgebungsat- mosphäre durch eine für Flüssigkeiten undurchläs- sige, für Gase jedoch durchlässige Gasaustau- schmembran (6) getrennt ist.

7. Zellkultivierungsgefäß nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Halteelement (2; 22) mit einem magnetischen, magnetisierbaren oder elek- trisch leitenden Läuferelement (25) fest verbunden ist, und daß außerhalb der Zellkulturkammer (4; 13) ein Drehfeldgenerator (26) vorgesehen ist, der mit dem Läuferelement (25) unter Rotation des Halte- elementes (2; 22) um die Mittelachse (23) der Spirale (7; 21) zusammenwirkt.

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

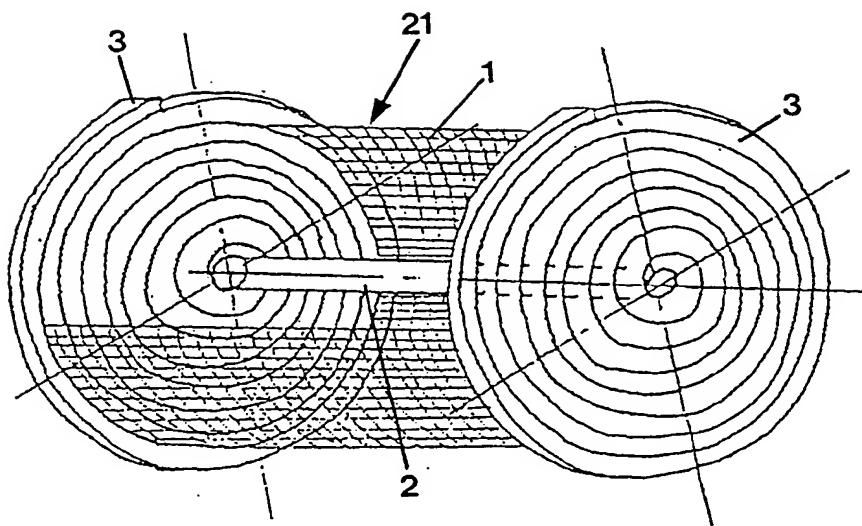


Fig. 1

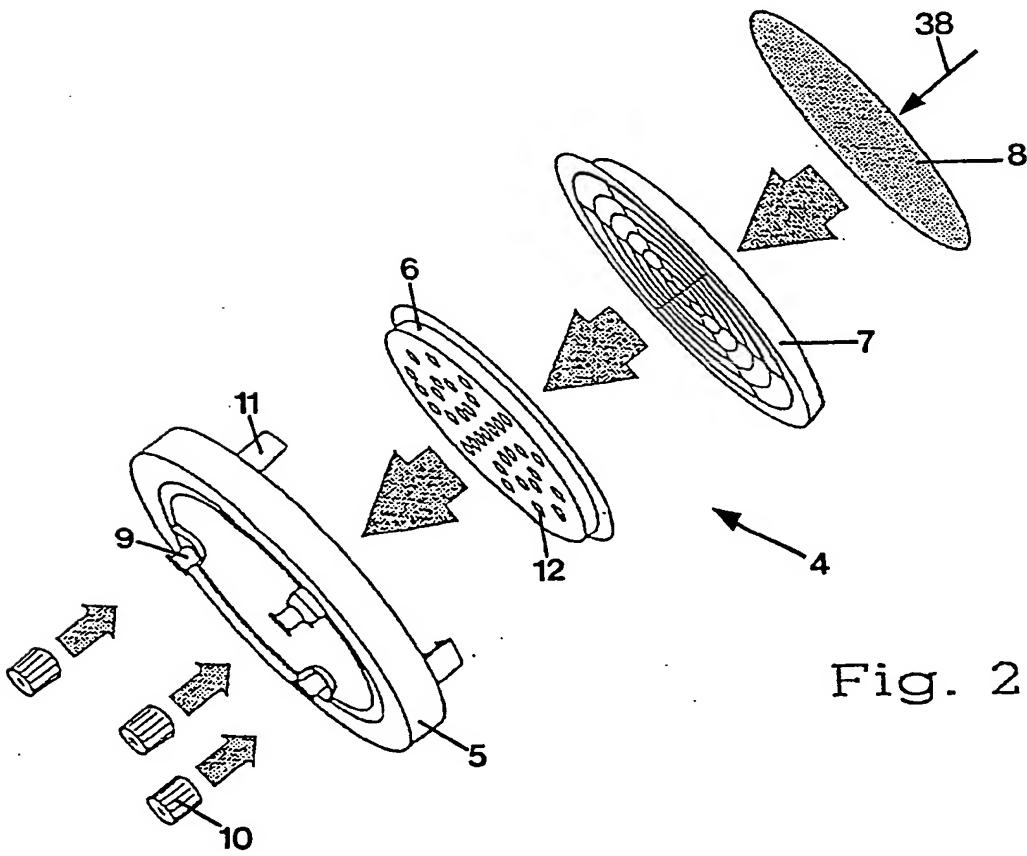


Fig. 2

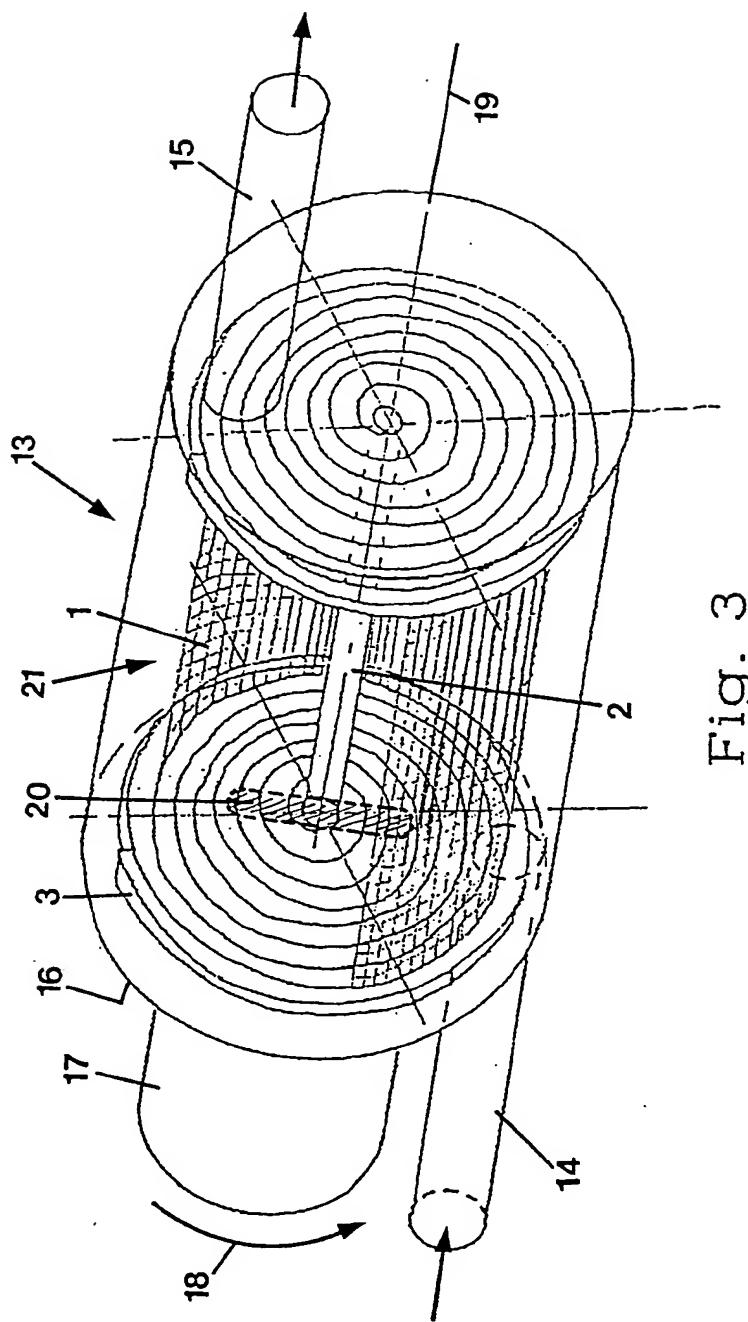


Fig. 3

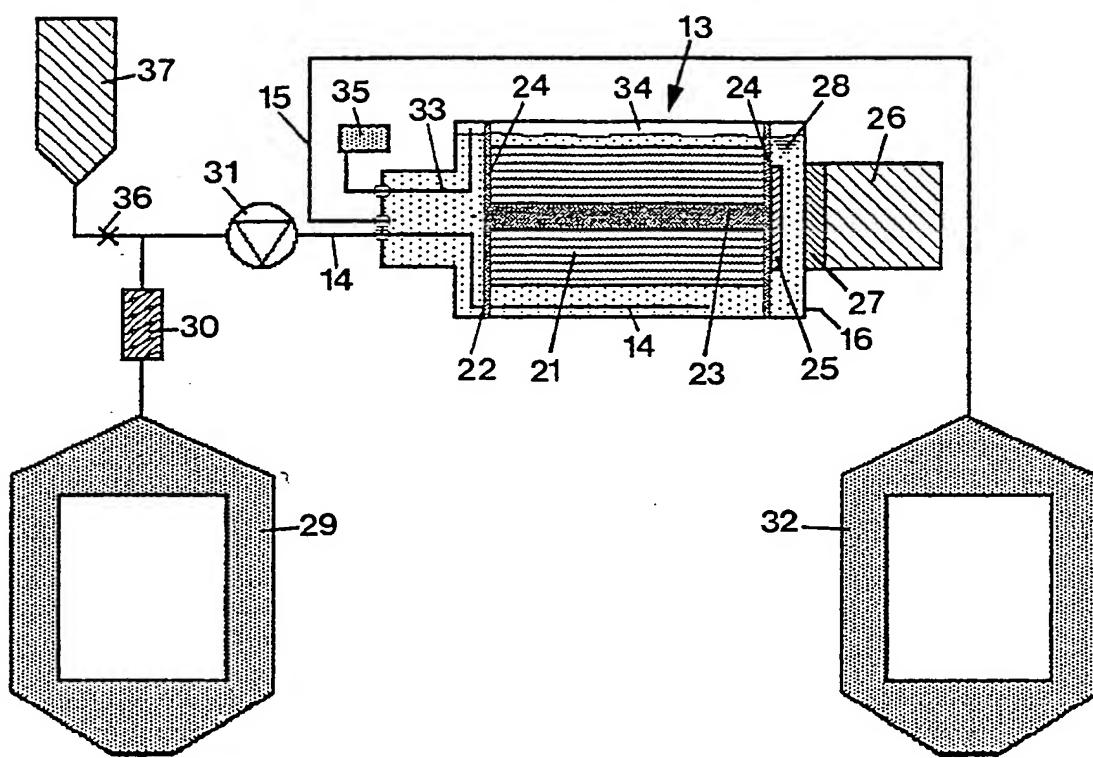


Fig. 4